

# APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PW 280106  
(M#)

Invention: Neue für das luxS-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Inventor (s): Brigitte BATHE  
Caroline KREUTZER  
Achim MARX  
Walter PFEFFERLE

Pillsbury Winthrop LLP  
Intellectual Property Group  
1100 New York Avenue, NW  
Ninth Floor  
Washington, DC 20005-3918  
Attorneys  
Telephone: (202) 861-3000

This is a:

- ☐ Provisional Application
- ☒ Regular Utility Application
- ☐ Continuing Application
  - ☒ The contents of the parent are incorporated by reference
- ☐ PCT National Phase Application
- ☐ Design Application
- ☐ Reissue Application
- ☐ Plant Application
- ☐ Substitute Specification
  - Sub. Spec. Filed \_\_\_\_\_
  - in App. No. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- ☐ Marked up Specification re
  - Sub. Spec. filed \_\_\_\_\_
  - In App. No. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

## SPECIFICATION

### Neue für das luxS-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das luxS-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren  
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das luxS-Gen abgeschwächt wird.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der  
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der  
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die  
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die  
25 Aminosäuren produzieren.  
30

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,  
10 sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan  
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid  
20 aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das luxS-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
25 die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz  
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Histidin  
5 Kinase LuxS aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte  
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1,  
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)  
innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den  
Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen  
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

20 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,  
enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1  
dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die  
Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt,  
enthält;

25 ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen  
Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende  
Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das luxS-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für die Histidin Kinase LuxS kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des luxS-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die Histidin Kinase LuxS kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus
- 5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.
- 10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.
- Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der
- 15 biologischen Aktivität der Histidin Kinase LuxS und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.
- 20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin,
- 25 L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das luxS-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.
- 30 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die

entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder  
5 Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder  
10 aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist,  
15 L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032  
20 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806  
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870  
Corynebacterium melassecola ATCC17965  
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539  
Brevibacterium flavum ATCC14067  
25 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme.

Das neue, für die Histidin Kinase LuxS kodierende luxS-Gen  
30 von *C. glutamicum* wurde isoliert. Die Histidin Kinase LuxS ist Teil eines Zwei-Komponenten-Systems. Zwei-Komponenten-Regulationssysteme zeichnen sich dadurch aus, dass

verschiedene Response-Regulator-Proteine durch Sensor-Kinasen aktiviert werden können.

- Zur Isolierung des luxS-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
- 5 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
- 10 Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde.
- 15 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
- 20 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
- Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).
- 25 Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und
- 30 rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend
- 35 wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete



Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

- 5 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical  
10 Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- Die neue für das luxS-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen  
15 Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des luxS-Genproduktes dargestellt.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind  
20 ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von  
25 Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins  
30 dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences  
35 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology

6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

- 5 In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich  
10 aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

- Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter  
15 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride  
20 gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der  
25 Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- 30 Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride  
35 sind weniger stabil und werden durch Waschen unter

stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des luxS-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des luxS-Gens oder die regulatorischen beziehungsweise katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.

Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in

5 der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)),

10 Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland,

15 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die

20 Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen

25 Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine

30 Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die

35 Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense

mutations") oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology

- 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode
- 5 der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan
- 10 (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei
- 15 unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des *recA*-Gens von *C. glutamicum* verwendet.
- 20 Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und
- 25 dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses
- 30 im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das luxS-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des luxS-Gens  
5 eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

10 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene  
15 erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren neben der  
20 Abschwächung des luxS-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase  
25 kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk  
30 (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- 5 • das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; 10 EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222)
- das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- 15 • das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- 20 • das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- 25 • das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des luxS-Gens



gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- 5 • das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- 10 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des luxS-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:
- 15 „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können
- 20 kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte
- 25 Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag,
- 30 Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der  
5 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum  
10 Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als  
15 Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,  
20 Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder  
25 die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren  
30 und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der  
35 Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise  
5 eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende  
10 Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis  
15 sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so  
20 wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174)  
25 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 26.02.2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen  
30 und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Top10/pCR2.1luxSint als DSM 14082.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

- Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.
- 10 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

#### Beispiel 1

- Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032
- 15 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.
- 20
- 25
- 30

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
5 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La  
10 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der  
15 Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin  
20 ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des Gens luxS

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep  
25 Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit  
30 shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp

mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

- Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung
- 5 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et
- 10 al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm
- 15 DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.
- 20 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-
- 25 5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und
- 30 Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem  
5 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research,  
10 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein  
15 offenes Leseraster von 1272 bp, welches als luxS-Gen bezeichnet wurde. Das luxS-Gen kodiert für ein Polypeptid von 423 Aminosäuren.

### Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die  
20 Integrationsmutagenese des luxS-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des luxS-Gens wurden die  
25 folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

luxS-int1:  
5` TCG TGA CCG TGG CTA TTG AT 3`  
luxS-int2:  
30 5` CTT GAG CAA TTC GCA GAA GG 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A

guide to methods and applications, 1990, Academic Press)  
mit der Taq-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim  
(Deutschland, Produktbeschreibung Taq DNA Polymerase,  
Product No. 1 146 165) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit  
5 Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer  
die Amplifikation eines 492 bp großen internen Fragmentes  
des luxS-Gens. Das so amplifizierte Produkt wurde in einem  
0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA  
10 Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA,  
USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO  
(Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10 mit dem  
Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical  
15 approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA,  
1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden  
Zellen erfolgte durch Ausplattieren des  
Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,  
Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring  
20 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989),  
der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.  
Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des  
QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und  
durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und  
25 anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft.  
Das Plasmid wurde pCR2.1luxSint genannt und ist in Figur 1  
dargestellt.

#### Beispiel 4

Integrationsmutagenese des luxS-Gens in dem Stamm DSM 5715  
30 Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1luxSint wurde nach  
der Elektroporationsmethode von Tauch et.al.(FEMS  
Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in  
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem



Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1luxSint kann in DSM5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715

5 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1luxSint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit  
10 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das luxSint-Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-

15 Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SalI, EcoRI und PstI geschnitten. Die  
20 entstehenden Fragmente wurden mittels der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1luxSint hatte innerhalb des chromosomalen luxS-Gens ins Chromosom von DSM5715  
25 inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCR2.1luxSint bezeichnet.

### Beispiel 5

#### Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm  
30 DSM5715::pCR2.1luxSint wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10  
5 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

## Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4  
eingestellt

10 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

## Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

- CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die
- 5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO<sub>3</sub> zugesetzt.

- Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und
- 10 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	8,0	12,64
DSM5715::pCR2.1luxSint	9,3	14,39

10

Beschreibung der Figur:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1luxSint.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR:	Kanamycin Resistenz-Gen
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys EcoRI
PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys PstI
SalI:	Schnittstelle des Restriktionsenzymys SalI
luxSint:	internes Fragment des luxS-Gens
ColE1:	Replikationsursprung des Plasmides ColE1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 &lt;120&gt; Neue für das luxS-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000457 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1902

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (342)..(1610)

&lt;223&gt; luxS-Gen

25

&lt;400&gt; 1

ggtaggagta aaaaacgcag gagggcgctcg aaaagcgttc gtctgtgccg taaccctga 60

30

cgcgctggcc gttggtatcg gcgacccagt cggtgcccag gtaggggcat gcggtttgtg 120

cggtgcgttc gaccgcgggc atcgcgtcga tgggaaggcc gtcagtaatt acttccgggg 180

ctgcctcggg ggtggtctct ggggttgctt caggttccgc cggggtacaa gcggtgagca 240

35

tgatggaagc agcgaggata gtaggtaatg tacgacgcac gcagtcaagc ctagatcgtg 300

tgtcggaaac cggacgcaat gagctcgatg ttgaaaccct t gtg aag aag ggg aat 356

Met Lys Lys Gly Asn

1 5

40

caa ccg ggc gcg atg agc tat cgc aac agt atc cac att ttg aca gcc 404

Gln Pro Gly Ala Met Ser Tyr Arg Asn Ser Ile His Ile Leu Thr Ala

10 15 20

45

tcg ctg ctg gtc gtg ggg ttg gga gct tcc gcc cgc ctg acg ctg ccg 452

Ser Leu Leu Val Val Gly Leu Gly Ala Ser Ala Arg Leu Thr Leu Pro

25 30 35

50

atg ttt gcg ctg tcg tgc gtg ctg ttg ttt gtg tgg ggt ttt ctg tac 500

Met Phe Ala Leu Ser Cys Val Leu Leu Phe Val Trp Gly Phe Leu Tyr

40 45 50

55

ttc tat gga tca acc aaa cgc gta gat ttg agc cac ggc atg cag ctg 548

Phe Tyr Gly Ser Thr Lys Arg Val Asp Leu Ser His Gly Met Gln Leu

55 60 65

ggc tgg ctg ttt gtg ctg acg ctg gtg tgg att ttt atg gtg ccg atc 596

Gly Trp Leu Phe Val Leu Thr Leu Val Trp Ile Phe Met Val Pro Ile

70 75 80 85

gtg ccc gtg tcc att tat ctg ctg ttc ccg ctg ttt ttc ctc tat cta 644  
Val Pro Val Ser Ile Tyr Leu Leu Phe Pro Leu Phe Phe Leu Tyr Leu  
90 95 100

5 cag gtg atg cct gac gtg aga ggc att att gcg att ttg ggt gcg aca 692  
Gln Val Met Pro Asp Val Arg Gly Ile Ile Ala Ile Leu Gly Ala Thr  
105 110 115

10 gcg att gcg att gcc agc cag tat tcc gtg ggg ttg acc ttt ggt ggt 740  
Ala Ile Ala Ile Ala Ser Gln Tyr Ser Val Gly Leu Thr Phe Gly Gly  
120 125 130

15 gtg atg ggt ccg gtg gtc tct gcg atc gtg acc gtg gct att gat tac 788  
Val Met Gly Pro Val Val Ser Ala Ile Val Thr Val Ala Ile Asp Tyr  
135 140 145

20 gcg ttc cgc acg ttg tgg cgg gtg aat aat gaa aag cag gaa ttg att 836  
Ala Phe Arg Thr Leu Trp Arg Val Asn Asn Glu Lys Gln Glu Leu Ile  
150 155 160 165

25 gat cag ttg att gaa act cgc tcc cag ctg gcg gtg acg gaa cga aat 884  
Asp Gln Leu Ile Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ala Val Thr Glu Arg Asn  
170 175 180

gcg ggt att gct gcg gaa cgt caa cgt att gcg cat gaa att cat gac 932  
Ala Gly Ile Ala Ala Glu Arg Gln Arg Ile Ala His Glu Ile His Asp  
185 190 195

30 acg gtc gcc cag gga ctc tcc tcc att caa atg ctg ctg cat gtc tct 980  
Thr Val Ala Gln Gly Leu Ser Ser Ile Gln Met Leu Leu His Val Ser  
200 205 210

35 gaa cag gag att ctc gtt gct gag atg gaa gag aag cca aag gag gcg 1028  
Glu Gln Glu Ile Leu Val Ala Glu Met Glu Glu Lys Pro Lys Glu Ala  
215 220 225

40 atc gtg aag aag atg cgc ctt gcc cga caa aca gcc tcc gac aat ctc 1076  
Ile Val Lys Lys Met Arg Leu Ala Arg Gln Thr Ala Ser Asp Asn Leu  
230 235 240 245

45 agt gag gct cgc gcg atg att gcg gcg ttg caa ccg gca gcg ctg tct 1124  
Ser Glu Ala Arg Ala Met Ile Ala Ala Leu Gln Pro Ala Ala Leu Ser  
250 255 260

aaa acc tcc ttg gaa gca gca ctt cac cgc gtc aca gaa ccg ttg ttg 1172  
Lys Thr Ser Leu Glu Ala Ala Leu His Arg Val Thr Glu Pro Leu Leu  
265 270 275

50 ggt att aat ttt gtg att tct gtc gac ggt gat gtt cgc caa ctg ccc 1220  
Gly Ile Asn Phe Val Ile Ser Val Asp Gly Asp Val Arg Gln Leu Pro  
280 285 290

55 atg aaa act gaa gcc acc ctt ctg cga att gct caa ggt gcg atc gga 1268  
Met Lys Thr Glu Ala Thr Leu Leu Arg Ile Ala Gln Gly Ala Ile Gly  
295 300 305

aat gtg gcg aaa cat tca gag gcg aaa aac tgc cac gtg aca cta acc 1316  
 Asn Val Ala Lys His Ser Glu Ala Lys Asn Cys His Val Thr Leu Thr  
 310 315 320 325

5 tac gaa gac aca gaa gta cgc ctt gat gtg gtt gat gac ggt gtg ggt 1364  
 Tyr Glu Asp Thr Glu Val Arg Leu Asp Val Val Asp Asp Gly Val Gly  
 330 335 340

10 ttt gag cct tcg gaa gtg tcc agt acc ccc gct ggc ctt ggc cat atc 1412  
 Phe Glu Pro Ser Glu Val Ser Ser Thr Pro Ala Gly Leu Gly His Ile  
 345 350 355

15 ggc tta acc gca ttg cag cag cgt gcg atg gaa ttg cac ggc gaa gtt 1460  
 Gly Leu Thr Ala Leu Gln Gln Arg Ala Met Glu Leu His Gly Glu Val  
 360 365 370

20 ata gtg gaa tct gca tat ggg cag ggt act gcg gta tct gca gca ttg 1508  
 Ile Val Glu Ser Ala Tyr Gly Gln Gly Thr Ala Val Ser Ala Ala Leu  
 375 380 385

ccg gtg gag cca cca gag ggg ttt gtc ggg gcg ccg gtt ttg gca gat 1556  
 Pro Val Glu Pro Pro Glu Gly Phe Val Gly Ala Pro Val Leu Ala Asp  
 390 395 400 405

25 tcg gac tca agt gct aca ggc gag gtt gaa cta agt tct cca act gac 1604  
 Ser Asp Ser Ser Ala Thr Gly Glu Val Glu Leu Ser Ser Pro Thr Asp  
 410 415 420

30 gat gag taaggctaga cttaaagtacg attcatctgc tcatcgatac tcttgaaggc 1660  
 Asp Glu

35 gcattttcat tcgaaacgaa gtgcgccatt gggaaggacc tagttcaaac aatgattcgc 1720  
 gtgctgcttg ctgatgacca cgaaatcgtg aggctcggac tccgagctgt gctggaaagc 1780  
 gccgaggaca ttgaagtggg gggcgaagtc tccaccgccg aaggtgcggg gcaggcagcc 1840  
 caagaaggcg gaatcgacgt catcttgatg gacctccgat tcggccccgg cgtccaagga 1900

40 ac 1902

45 <210> 2  
 <211> 423  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <400> 2  
 Met Lys Lys Gly Asn Gln Pro Gly Ala Met Ser Tyr Arg Asn Ser Ile  
 1 5 10 15  
 His Ile Leu Thr Ala Ser Leu Leu Val Val Gly Leu Gly Ala Ser Ala  
 20 25 30

55 Arg Leu Thr Leu Pro Met Phe Ala Leu Ser Cys Val Leu Leu Phe Val  
 35 40 45

Trp Gly Phe Leu Tyr Phe Tyr Gly Ser Thr Lys Arg Val Asp Leu Ser  
 50 55 60

His Gly Met Gln Leu Gly Trp Leu Phe Val Leu Thr Leu Val Trp Ile  
 65 70 75 80  
 5 Phe Met Val Pro Ile Val Pro Val Ser Ile Tyr Leu Leu Phe Pro Leu  
 85 90 95  
 Phe Phe Leu Tyr Leu Gln Val Met Pro Asp Val Arg Gly Ile Ile Ala  
 100 105 110  
 10 Ile Leu Gly Ala Thr Ala Ile Ala Ile Ala Ser Gln Tyr Ser Val Gly  
 115 120 125  
 Leu Thr Phe Gly Gly Val Met Gly Pro Val Val Ser Ala Ile Val Thr  
 130 135 140  
 Val Ala Ile Asp Tyr Ala Phe Arg Thr Leu Trp Arg Val Asn Asn Glu  
 145 150 155 160  
 20 Lys Gln Glu Leu Ile Asp Gln Leu Ile Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ala  
 165 170 175  
 Val Thr Glu Arg Asn Ala Gly Ile Ala Ala Glu Arg Gln Arg Ile Ala  
 180 185 190  
 25 His Glu Ile His Asp Thr Val Ala Gln Gly Leu Ser Ser Ile Gln Met  
 195 200 205  
 Leu Leu His Val Ser Glu Gln Glu Ile Leu Val Ala Glu Met Glu Glu  
 210 215 220  
 Lys Pro Lys Glu Ala Ile Val Lys Lys Met Arg Leu Ala Arg Gln Thr  
 225 230 235 240  
 35 Ala Ser Asp Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ala Met Ile Ala Ala Leu Gln  
 245 250 255  
 Pro Ala Ala Leu Ser Lys Thr Ser Leu Glu Ala Ala Leu His Arg Val  
 260 265 270  
 40 Thr Glu Pro Leu Leu Gly Ile Asn Phe Val Ile Ser Val Asp Gly Asp  
 275 280 285  
 Val Arg Gln Leu Pro Met Lys Thr Glu Ala Thr Leu Leu Arg Ile Ala  
 290 295 300  
 45 Gln Gly Ala Ile Gly Asn Val Ala Lys His Ser Glu Ala Lys Asn Cys  
 305 310 315 320  
 His Val Thr Leu Thr Tyr Glu Asp Thr Glu Val Arg Leu Asp Val Val  
 325 330 335  
 Asp Asp Gly Val Gly Phe Glu Pro Ser Glu Val Ser Ser Thr Pro Ala  
 340 345 350  
 55 Gly Leu Gly His Ile Gly Leu Thr Ala Leu Gln Gln Arg Ala Met Glu  
 355 360 365

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Leu His Gly Glu Val Ile Val Glu Ser Ala Tyr Gly Gln Gly Thr Ala  
 370 375 380

5 Val Ser Ala Ala Leu Pro Val Glu Pro Pro Glu Gly Phe Val Gly Ala  
 385 390 395 400

Pro Val Leu Ala Asp Ser Asp Ser Ser Ala Thr Gly Glu Val Glu Leu  
 405 410 415

10 Ser Ser Pro Thr Asp Asp Glu  
 420

15 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>  
 <223> Primer luxS-int1

25 <400> 3  
 tcgtgaccgt ggctattgat 20

30 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum

35 <220>  
 <223> Primer luxS-int2

35 <400> 4  
 cttgagcaat tcgcagaagg 20

000457 BT / IP  
 32